

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0612761-4 A2**

(22) Data de Depósito: 30/06/2006
(43) Data da Publicação: 30/11/2010
(RPI 2082)



(51) *Int.Cl.:*
A01N 63/00

(54) Título: **VETORES AAV CODIFICANDO
SUPERÓXIDO DISMUTASE**

(30) Prioridade Unionista: 07/07/2005 US 60/697,450

(73) Titular(es): GENZYME CORPORATION

(72) Inventor(es): MOHAMMAD D. DOROUDCHI

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006025980 de 30/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/008486 de 18/01/2007

(57) **Resumo:** VETORES AAV CODIFICANDO SUPEROXIDO DISMUTASE. A presente invenção refere-se a vetores de vírus adeno-associado (AAV) codificando superóxido dismutase (SOD), onde o vetor AAV codificando SOD (AAV-SOD) pode ser usado para aplicar o gene SOD a células alvo. As células alvo podem estar dentro de um indivíduo tendo uma doença ou condição para a qual a aplicação de SOD às células alvo provê um benefício terapêutico e/ou um efeito terapêutico no indivíduo. Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um sistema modelo para avaliação de compostos quanto à eficácia em tratamento de esclerose amiotrófica lateral (ALS). O sistema modelo pode compreender uma pluralidade de células transduzidas com um vetor AAV codificando um gene SOD; as células transduzidas podem exibir uma mudança fenotípica associada com ALS. O sistema modelo da invenção pode ser usado para avaliar compostos quanto à eficácia no tratamento de ALS.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "VETORES
AAV CODIFICANDO SUPERÓXIDO DISMUTASE".

O presente pedido de patente reivindica prioridade sob o 35
U.S.C. § 119(e) ao Pedido Provisório U.S. No. 60/697.450 depositado em 7 de
5 julho de 2005, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência.

Campo da Técnica

A presente invenção refere-se a modelos *in vitro* para a triagem
de compostos quanto à eficácia em tratamento de esclerose lateral amiotró-
fica (ALS). A presente invenção refere-se também a vetores e métodos de
10 terapia de gene.

Antecedentes

Doenças neurodegenerativas apresentam questões de saúde
públicas importantes. Por exemplo, esclerose lateral amiotrófica (ALS) é uma
doença letal progressiva cruel que envolve destruição seletiva de neurônios
15 motores. Informação adicional com relação à ALS pode ser encontrada no
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) número de acesso 105400 e
em Rowland e Shneider (2001) *Amyotrophic lateral sclerosis, New Eng. J.*
Med. 344:1688-1700, cujas revelações são aqui incorporadas a título de re-
ferência em suas totalidades.

20 Mutações em genes codificando superóxido dismutase (SOD)
estão associadas com ALS. Três variantes de SOD são conhecidas estar
presentes em mamíferos. O SOD citoplásmico é uma enzima de cobre zinco
(Cu/Zn SOD) codificada por SOD1 (Weisiger e Fridovich (1973) *J. Biol.*
Chem. 248, 4793-4796). Conforme discutido *infra*, defeitos genéticos em
25 SOD1 foram associados com esclerose lateral amiotrófica familiar (fALS).
SOD mitocondrial (MnSOD) está associado com manganês e é codificada
por SOD2. Li e outros ((1995) *Nature Genetics* 11, 376-381) descreve um
camundongo mutante onde o gene codificando SOD2 foi inativado. Uma ter-
ceira SOD de mamífero, codificada por SOD3 (Carlsson e outros (1995)
30 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92, 6264-6268), também contendo cobre e zinco,
está localizada abundantemente extracelularmente. Inativação deste gene
não resulta em nenhum fenótipo observável.

Aproximadamente 20% de fALS estão ligados a mutações no gene SOD1 (Julien, J.P., *Cell* (2001) 104:581-591). Camundongos transgênicos superexpressando o gene SOD1 mutante onde glicina 93 foi mutada para alanina (G93A) desenvolvem um distúrbio paralítico de início adulto
5 dominantemente herdado que tem muitas das características clínicas e patológicas de fALS (Gurney e outros, *Science* (1994) 264:1772-1775). No entanto, até agora, os mecanismos moleculares que levam à degeneração de neurônio motor em ALS e maioria das doenças de neurônio motor permanecem pobremente compreendidos, e atualmente não há nenhuma terapia disponível para prevenir ou curar ALS.
10

Métodos de triagem de compostos eficazes no tratamento de ALS são ineficientes e de trabalho intensivo, impedindo o desenvolvimento de fármaco. Embora os camundongos transgênicos ALS discutidos acima representem um método *in vivo* útil para triagem da eficácia de compostos
15 candidatos, experimentos com camundongos são relativamente caros, consomem tempo e não são bem adequados para triagem de resultado em grande quantidade. Outros experimentos se apóiam no estudo de expressão de gene em amostras de humano *post-mortem*, que não são abundantes, e não-submetidas à manipulação experimental controlada.

Um modelo eficiente *in vitro* para ALS facilitaria a triagem rápida de compostos terapêuticos potenciais. Compostos demonstrando efeitos benéficos *in vitro* poderiam então ser validados mais com teste adicional, por exemplo, usando os camundongos transgênicos discutidos acima. Métodos
20 *in vitro* existentes, no entanto, são inadequados para triagem de resultado em grande quantidade. Por exemplo, em um método, células individuais em cultura primária são microinjetadas com um plasmídeo codificando um gene SOD1 mutante (por exemplo, G93A) para imitar os efeitos de superexpressão do mesmo gene mutante em ALS. Tais células podem então ser trata-
25 das com um composto de interesse para determinar se o composto é capaz de reverter o(s) efeito(s) fenotípico(s) associado(s) com a superexpressão de SOD1, tal como formação de agregados ou inclusões. Microinjeção, no entanto, é de trabalho intensivo e pode ser realizada em apenas um número
30

limitado de células, tornando difícil se obter resultados estatisticamente robustos.

Existe a necessidade de um sistema modelo para triagem de compostos quanto à eficácia em reverter ou melhorar os efeitos de ALS, modelo que deve ser condescendente à triagem de resultado em grande quantidade e permitir a avaliação de um número estatisticamente significativo de células para determinar a eficácia de compostos de interesse.

SOD do tipo selvagem (não o mutante) pode ser útil como um agente terapêutico. Vários distúrbios são o resultado de estresse oxidativo, isto é, a presença de espécies oxigênio reativas prejudiciais (ROS) em células, tal como superóxido. Vide, por exemplo, Cash e outros, (2004) *Med. Chem. Rev.* 1:19-23. Superóxido dismutase catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O peróxido de hidrogênio produzido por SOD é subsequentemente convertido em oxigênio molecular e água por catalase, completando a conversão de superóxido para formas menos reativas, e então, menos prejudiciais, de oxigênio.

Antioxidantes, tal como vitamina A, vitamina C, glutathione, vitamina E, carotenos, ácido lipóico e coenzima Q₁₀, podem ser administrados para reduzir a produção e acúmulo de tais espécies, mas tais agentes podem não acumular para níveis eficazes dentro de células quando administrados sistemicamente. Como uma alternativa, aplicação sustentada da enzima SOD a tais células poderia ajudar a diminuir os efeitos prejudiciais de formação de superóxido.

Existe a necessidade de vetores e métodos de terapia que sejam capazes de aplicar um gene de SOD a células em um indivíduo que possa se beneficiar da atividade de SOD. Tais indivíduos incluem aqueles que sofrem de distúrbios causando produção ou acúmulo em excesso de superóxido, aqueles expostos a condições ambientais causando produção de superóxido ou acúmulo em excesso, e até mesmo aqueles sujeitos ao dano oxidativo cumulativo associado com envelhecimento normal.

Sumario da Invenção

Em um aspecto, a invenção refere-se a vetores de vírus adeno-

associados (AAV) codificando superóxido dismutase (SOD). Em uma modalidade o SOD é SOD 1. Em outra modalidade, o gene de SOD1 contém uma mutação associada com ALS, tal como Gly93Ala.

Em uma modalidade, o vetor AAV codificando SOD (AAV-SOD) é usado para aplicar o gene de SOD a células-alvo. Em uma modalidade as células-alvo estão dentro de um indivíduo tendo uma doença ou condição para a qual aplicação de SOD às células-alvo provê um benefício terapêutico. Em algumas modalidades, aplicação de SOD resulta em um efeito terapêutico no indivíduo. Em outras modalidades, a doença ou condição é selecionada do grupo consistindo em doença de Parkinson, doença de Huntington, doença do olho degenerativa (por exemplo, degeneração macular, retinite pigmentosa), doença de Alzheimer, artrite reumatóide, doença de Chron, doença de Peyronie, colite ulcerativa, isquemia cerebral (derrame), infarto do miocárdio (ataque cardíaco), trauma cerebral e/ou do cordão espinhal, dano por reperfusão, ALS, síndrome de Down, cataratas, esquizofrenia, epilepsia, leucemia humana e outros cânceres e diabetes.

Em um outro aspecto a invenção refere-se a um sistema modelo para triagem de compostos quanto à eficácia em tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ALS) compreendendo uma pluralidade de células transduzidas com um vetor AAV codificando um gene de SOD1 contendo uma mutação associada com ALS, tal como Gly93Ala. Em várias modalidades, o vetor AAV da invenção é derivado de AAV-2, AAV-5 ou AAV-6.

Em uma modalidade, a pluralidade de células transduzidas com o vetor AAV compreende pelo menos 80% das células na população onde elas são encontradas, por exemplo, uma cultura primária de células de cordão espinhal de roedor.

Em algumas modalidades as células transduzidas exibem uma mudança fenotípica associada com ALS. Em outras modalidades, um ou mais compostos avaliados reduzem ou melhoram esta mudança fenotípica.

Em ainda outro aspecto, a invenção refere-se a métodos de triagem de compostos quanto à eficácia em tratamento de ALS usando um sistema modelo da invenção.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é um diagrama esquemático de um vetor rAAV para aplicação de hSOD1--Gly93Ala, referido como pVm-G93ASOD. Expressão de hSOD1-Gly93Ala é direcionada pelo promotor de beta-actina de galinha.

5 O cassete de expressão está localizado entre duas seqüências ITR de AAV-2. SOD1-Gly91Ala é também referido aqui como SOD "mutante".

A Figura 2 é um diagrama esquemático de um vetor rAAV para aplicação de SOD1 humano do tipo selvagem, referido como pVm-WTSOD. Expressão de wtSOD1 é direcionada pelo promotor de beta-actina de galinha. O cassete de expressão está localizado entre duas seqüências ITR de AAV-2.

10

Descrição Detalhada

A prática da presente invenção vai empregar, a menos que de outro modo indicado, métodos convencionais de virologia, microbiologia, bio-

15 logia de célula e molecular e técnicas de DNA recombinante dentro da habilidade na técnica. Tais técnicas são explicadas integralmente na literatura. Vide, por exemplo, Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Edução Atual); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. I & II (D. Glover, Ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., Edição Atual); *Nucleic Acid*

20 *Hybridization* (B. Hanes & S. Higgins, Eds., Edição Atual); *Transcription and Translation* (B. Hanes & S. Higgins, eds., Edição Atual); *CRC Handbook of Parvoviruses*, Vol. I & II (P. Tijssen, ed.); *Fundamental Virology*, 2a Edição, Vol. I & II (B.N. Fields e D.M. Knipe, Eds.); *Freschney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (Wiley-Liss, Terceira Edição); e Ausubel e

25 outros (1991) *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley Interscience, NY).

Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e acessos a bancos de dados (incluindo acessos OMIM) citados aqui são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade.

30 A presente invenção refere-se a vetores AAV codificando SOD que podem ser usados para criar um sistema modelo *in vitro* para ALS ou como agentes terapêuticos.

Mutações de SOD1 associadas com ALS

No aspecto da invenção com relação a um sistema modelo de ALS, o gene SOD codificado pelo vetor AAV compreende uma mutação associada com ALS. "Uma mutação associada com ALS", conforme aqui usado, refere-se a uma mutação em um gene de SOD que acontece com maior frequência em indivíduos tendo ALS do que em indivíduos que não têm ALS. A sequência de amino ácido de wtSOD1 é apresentada na Tabela 1. Mutações conhecidas em SOD1 incluem Ala4Ser, Ala4Thr, Ala4Val (A4V; 147450.0012), Cys6Gly, Cys6Phe, Val7Glu, Leu8Val, Leu8Gln, Gly10Val, Gly12Arg, Val14Met, Val14Gly, Gly16Ala, Gly16Ser, Asn19Ser, Phe20Cys, Glu21Gly, Glu21Lys, Gln22Leu, Gly37Arg (G37R; 147450.0001), Leu38Arg, Leu38Val (L38V; 147450.0002), Gly41Asp (G41D; 147450.0004), Gly41Ser, His43Arg, Phe45Cys, His46Arg (H46R; 147450.0013), Val47Phe, His48Arg, His48Gln, Glu49Lys, Thr54Arg, Cys57Arg, Ser59Ile, Asn65Ser, Leu67Arg, Gly72Cys, Gly72Ser, Asp76Tyr, Asp76Val, His80Ala, His80Arg, Leu84Val, Gly85Arg, Asn86Asp, Asn86Ser, Val87Met, Val87Ala, Ala89Thr, Ala89Val, Asp90Ala, Asp90Val, Gly93Ala (G93A; 147450.0008), Gly93Arg, Gly93Asp, Gly93Cys (G93C; 147450.0007), Gly93Ser, Gly93Val, Ala95Thr, Asp96Asn, Val97Met, Glu100Gly, Glu100Lys, Asp101Asn, Asp101Gly, Asp101His, Ile104Phe, Leu106Val, Ile113Thr (I113T; 147450.0011), Leu126Ter, Ser134Asn, Leu144Ser e Ala145Thr. Números seguindo mutações, quando presentes, representam números de referência OMIM para essas mutações. Mutações de SOD1 são também reveladas em Rosen e outros (1993). Mutações em gene de superóxido dismutase de Cu/Zn estão associadas com esclerose lateral amiotrófica familiar, *Nature* 362:59-62; Cudkowicz e outros, (1997) "Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis", *Ann. Neurol.* 41:210-221; Belleruche e outros (1995). "Familial amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease (FALS): a review of current developments", *J. Med. Genet.* 32:841-847. Embora várias mutações em SOD1 sejam reveladas aqui, nenhum desses mutantes será útil na criação de modelos de doença para ALS.

Tabela 1: Seqüência de Amino Ácido de wtSOD1

1	ATKAVCVLKG DGPVQGIINF EQKESNGPVK VWGSIKGLTE
	GLHGFHVHEF
51	GDNTAGCTSA GPHFNPLSRK HGGPKDEERH VGD LGNVTAD
	KDGVADVSIE
101	DSVISLSGDH CIIGRTLTVH EKADDLGKGG NEESTKTGNA
	GSRLACGVIG
151	IAQ (SEQ ID NO. 1)

Vetores de Vírus Adeno-Associado

Vírus adeno-associado (AAV) tem sido usado com sucesso para aplicar genes para terapia de gene e testes clínicos em seres humanos têm demonstrado grande promessa (vide, por exemplo, Kay e outros, *Nat. Genet.* (2000) 24:257-261). Como o único sistema de vetor viral baseado em um vírus não-patogênico e de replicação defeituosa, vírions de AAV recombinantes têm sido usados com sucesso para estabelecer transferência de gene eficiente e sustentada de ambas células em proliferação e terminalmente diferenciadas em uma variedade de tecidos sem respostas imunes detectáveis ou toxidez (Bueler, H., *Biol. Chem.* (1999) 380:613-622).

O genoma de AAV é uma molécula de DNA de filamento simples, linear, contendo cerca de 4681 nucleotídeos. O genoma de AAV geralmente compreende um genoma de não-repetição interno flanqueado em cada extremidade por repetições terminais invertidas (ITRs). As ITRs são aproximadamente de 145 pares de base (pb) de comprimento. As ITRs têm funções múltiplas, incluindo como origens de replicação de DNA e como sinais de empacotamento para o genoma viral. A porção não-repetida interna do genoma inclui duas estruturas de leitura aberta grandes, conhecidas como os genes de replicação (*rep*) e capsídeo (*cap*) de AAV. Os genes *rep* e *cap* codificam proteínas virais que permitem que o vírus replique e empacote em um vírion. Em particular, uma família de pelo menos quatro proteínas virais é expressa da região *rep* de AAV, Rep 78, Rep 68, Rep 52 e Rep 40, nomeadas de acordo com seu peso molecular aparente. A região *cap* de AAV codifica pelo menos três proteínas, VP1, VP2 e VP3.

AAV foi construído para aplicar genes de interesse através de deleção da porção de não-repetição interna do genoma de AAV (isto é, os genes *rep* e *cap*) e inserção de um gene heterólogo entre as ITRs. O gene heterólogo é tipicamente funcionalmente ligado a um promotor heterólogo (constitutivo, específico de célula ou induzível) capaz de direcionar expressão de gene nas células-alvo do paciente sob condições apropriadas. Sinais de terminação, tal como sítios de poliadenilação, podem ser também incluídos.

AAV é um vírus dependente de auxiliar; isto é, ele requer co-infecção com um vírus auxiliar (por exemplo, adenovírus, herpesvírus ou vaccínia), a fim de formar vírions de AAV no selvagem. Na ausência de co-infecção com um vírus auxiliar, AAV estabelece um estado latente onde o genoma viral se insere em um cromossomo da célula-hospedeiro, mas vírions infecciosos não são produzidos. Infecção subsequente por um vírus auxiliar "resgata" o genoma integrado, permitindo que ele replique e empacote seu genoma em um vírion de AAV infeccioso. Embora AAV possa infectar células de espécies diferentes, o vírus auxiliar deve ser da mesma espécie que a célula-hospedeiro. Então, por exemplo, AAV humano vai replicar em células caninas co-infectadas com um adenovírus canino.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, um método de transfecção triplo (descrito em detalhe na Patente U.S. No. 6.001.650, incorporada aqui a título de referência em sua totalidade) é usado para produzir vírions de rAAV porque este método não requer o uso de um vírus auxiliar infeccioso, permitindo que os vírions de rAAV sejam produzidos sem qualquer vírus auxiliar detectável presente. Isto é conseguido através do uso de três vetores para produção de vírion de rAAV: um vetor de função auxiliar de AAV, um vetor de função acessório e um vetor de expressão de rAAV. Uma pessoa versada na técnica vai compreender que as seqüências de ácido nucléico codificadas por esses vetores podem ser providas em dois ou mais vetores em várias combinações.

O vetor de função auxiliar de AAV codifica as seqüências de função auxiliar de AAV (isto é, *rep* e *cap*), que funcionam *in trans* para replicação e encapsidação de AAV produtivas. De preferência, o vetor de função

auxiliar de AAV apóia produção de vetor AAV eficiente sem gerar quaisquer vírions de AAV detectáveis contendo genes *rep* e *cap* funcionais. Um exemplo de tal vetor, pHLP19 é descrito na Patente U.S. No. 6.001.650, incorporada aqui a título de referência em sua totalidade. Os genes *rep* e *cap* do

5 vetor de função auxiliar AAV podem ser derivados de qualquer um dos sorotipos de AAV conhecidos, conforme acima explicado, por exemplo, o vetor de função auxiliar AAV pode ter um gene *rep* derivado de AAV-2 e um gene *cap* derivado de AAV-6. Uma pessoa versada na técnica vai reconhecer que outras combinações de genes *rep* e *cap* são possíveis, a característica de

10 definição sendo a habilidade em apoiar produção de vírion de rAAV.

O vetor de função acessório codifica seqüências de nucleotídeo para funções virais e/ou celulares derivadas de não-AAV das quais AAV é dependente para replicação, referidas aqui como funções acessório. As funções acessório incluem aquelas funções requeridas para replicação de AAV,

15 incluindo, sem limitação, aquelas porções envolvidas em ativação de transcrição de gene de AAV, união de mRNA de AAV específico de estágio, replicação de DNA de AAV, síntese de produtos de expressão de *cap* e montagem de capsídeo de AAV. Funções acessório baseadas em virais podem ser derivadas de qualquer um dos vírus auxiliares bem conhecidos tal como a-

20 adenovírus, herpesvírus (outros que não o vírus herpes simplex tipo-1) e vírus vaccínia. Em uma modalidade preferida, o plasmídeo de função acessório pLadeno5 é usado. Detalhes com relação a pLadeno5 são descritos na Patente U.S. No. 6.004.797, incorporada aqui a título de referência em sua totalidade. Este plasmídeo provê um conjunto completo de funções acessório de

25 adenovírus para produção de vetor AAV, mas não tem os componentes necessários para formar adenovírus competentes em replicação.

Vetores de Expressão AAV Recombinantes

Vetores de expressão AAV recombinantes (rAAV) são construídos usando técnicas conhecidas para prover componentes operativamente

30 ligados incluindo elementos de controle (incluindo uma região de iniciação transcripcional), o polinucleotídeo de codificação de SOD de interesse e uma região de terminação transcripcional. O construto resultante contém os com-

ponentes operativamente ligados (5' e 3') ligados com seqüências de ITR de AVV funcionais.

Em modalidades direcionadas a um sistema modelo para o estudo de ALS, os elementos de controle são selecionados para serem funcionais em uma célula neuronal de mamífero. Em modalidades direcionadas a vetores AAV-SOD para usos terapêuticos, os elementos de controle são selecionados para serem funcionais na célula-alvo ou tecido de interesse. Embora elementos de controle específicos de tecido e reguláveis sejam desejados em algumas modalidades da presente invenção, outras modalidades envolvem o uso de promotores constitutivos.

As seqüências de nucleotídeo de regiões de ITR de AAV são conhecidas. Vide, por exemplo, Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Berns, K.I. "Parvoviridae and their Replication" em *Fundamental Virology*, 2a Edição, (B.N. Fields e D.M. Knipe, eds) para a seqüência de AAV-2. ITRs de AVV usadas nos vetores da invenção não precisam ter uma seqüência de nucleotídeo do tipo selvagem, e podem ser alteradas, por exemplo, através da inserção, deleção ou substituição de nucleotídeos. Adicionalmente, ITRs de AAV podem ser derivadas de qualquer um de vários sorotipos de AAV, incluindo, sem limitação, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 e AAV-8, etc. ITRs de AAV podem ser também derivadas, por exemplo, de variantes de AAV isoladas de fontes de murino, caprino ou bovino. Ainda, as ITRs 5' e 3' que flanqueiam uma seqüência de nucleotídeo selecionada em um vetor de expressão AAV não precisam ser necessariamente idênticas ou derivadas do mesmo sorotipo ou isolato de AAV, contanto que elas funcionem conforme pretendido, isto é, para permitir excisão e resgate da seqüência de interesse a partir do genoma ou vetor da célula-hospedeiro, e permitir integração da molécula de DNA no genoma da célula recipiente quando produtos de gene *rep* de AAV estão presentes na célula.

Sorotipos de AAV diferentes podem ser usados para especificamente direcionar tipos de célula diferentes. Por exemplo, em várias modalidades, os vetores da presente invenção são derivados de AAV-2, AAV-5 e

AAV-6. Por exemplo, em culturas neurais motoras de rato primárias, vetores derivados de AAV-6 direcionam a expressão de SOD principalmente em neurônios; vetores derivados de AAV-2 direcionam a expressão de SOD em ambos neurônios e glia; e vetores derivados de AAV-5 direcionam expressão de SOD principalmente em glia. hSOD1-Gly93Ala causa mudanças morfológicas em neurônios motores que estão associadas com patologia quando aplicado usando um vetor derivado de AAV-2 mas não causa patologia em neurônios motores quando aplicado usando um vetor derivado de AAV-5.

Usos Terapêuticos de AAV-SOD

Em várias modalidades da invenção com relação a usos terapêuticos de rAAV-SOD, vetores rAAV são usados para aplicar os genes SOD1, SOD2 ou SOD3, ou qualquer combinação deles. Em uma modalidade particular, SOD1 é aplicado.

Os vetores descritos aqui podem ser usados para tratar ou prevenir doenças ou condições associadas com níveis indesejados de ROS e radicais livres, ou estresse oxidativo em geral. ROS são também geradas como efeitos colaterais prejudiciais de alguns fármacos terapêuticos. Vide, por exemplo, Chan e outros (1996) *Adv. Neurol.* 71:271-279; DiGiuseppi e Fridovich (1984) *Crit. Rev. Toxicol.* 12:315-342. Condições que podem ser tratadas usando os vetores AAV-SOD da presente invenção incluem doença de Parkinson, doença de Huntington, doenças degenerativas do olho (por exemplo, degeneração macular, retinite pigmentosa), doença de Alzheimer, artrite reumatóide, doença de Crohn, doença de Peyronie, colite ulcerativa, isquemia cerebral (derrame), infarto do miocárdio (ataque cardíaco), trauma cerebral e/ou ao cordão espinhal, dano por reperfusão, ALS, síndrome de Down, cataratas, esquizofrenia, epilepsia, leucemia humana e outros cânceres e diabetes.

Até mesmo indivíduos sofrendo de nada mais do que dano oxidativo normal associado com envelhecimento podem se beneficiar dos vetores e métodos da presente invenção. Um aumento progressivo de estresse oxidativo devido à formação de ROS e radicais livres acontece durante o envelhecimento (vide, por exemplo, Mecocci, P. e outros (2000) *Free Radio.*

Biol. Med., 28:1243-1248), conforme evidenciado por um aumento na formação de peroxidatos de lipídeo em tecidos de rato (Erdinciler, D. S. e outros (1997) *Clin. Chim. Acta*, 265:77-84) e células sangüíneas em pacientes humanos mais velhos (Congi, F. e outros (1995) *Presse. Med.*, 24:1115-1118).

- 5 Uma revisão recente (Niki, E., *Intern. Med.* (2000) 39:324-326) relatou que dano a tecido aumentado por ROS e radicais livres poderia ser atribuído aos níveis menores das enzimas antioxidativas SOD e CAT que acontecem durante envelhecimento. Por exemplo, animais transgênicos gerados através de inserção de genes de SOD extra no genoma de camundongos foram verifi-
- 10 ficados ter níveis menores de dano por ROS e radical livre. Tais animais também tinham um tempo de vida prolongado. Evidência mais recente indicou que administração de um pequeno composto manganês porfirina que imita atividade de SOD levou a uma extensão de 44% de tempo de vida do verme nematóide *Caenorhabditis elegans* (S. Melow e outros (2000) *Science*, 289:1567-1569).
- 15 Deste modo, os vetores e métodos da presente invenção podem prevenir e/ou agir contra o dano a tecido aumentado e expectativa de vida menor causados pelos níveis elevados de ROS e radicais livres que acompanham o processo de envelhecimento.

Conforme aqui usado, "tratamento" de ALS inclui reversão de

20 dano preexistente, prevenção de dano adicional e diminuição da progressão de dano, cada um dos quais é um resultado terapeuticamente desejável. Um vetor rAAV-SOD terapêutico, ou um composto encontrado usando um sistema modelo de ALS *in vitro* da presente invenção, não precisa reverter dano preexistente para ser considerado terapeuticamente eficaz. Qualquer trata-

25 mento que pelo menos diminua a progressão de ALS em um indivíduo pode ser considerado terapeuticamente eficaz.

Sistemas Modelo In Vitro de ALS para Avaliar Compostos Terapêuticos

Conforme descrito em mais detalhe nos Exemplos, os vetores AAV-SOD da presente invenção podem ser usados para criar um sistema

30 modelo *in vitro* para ALS, sistema modelo que pode ser usado para avaliar compostos quanto à eficácia no tratamento ou prevenção de ALS. Em uma modalidade, um SOD1 mutante conhecido associado com ALS (SOD1-

Gly93Ala) é clonado em um vetor AAV e um vírion recombinante (rAAV-SOD1-Gly93Ala) é produzido. rAAV-SOD1-Gly93Ala é então usado para transduzir uma cultura primária a partir de um tecido representativo, tal como cordão espinhal de rato ou cérebro de rato. A cultura é então experimentada 3-5 dias pós-transfecção para confirmar que alguns dos neurônios dentro da cultura exibem mudanças morfológicas associadas com ALS, tal como a formação de agregados de SOD ou vacuolização. Tais células são referidas aqui como "células do tipo ALS". Tais agregados podem ser visualizados através de imunoistoquímica. Em modalidades preferidas, a porcentagem de células tipo ALS na cultura é alta, tal como 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% ou mais. Quanto maior a porcentagem de células do tipo ALS em uma cultura maior o número de compostos que podem ser avaliados, ou maior o número de réplicas para cada composto individual, usando as células da cultura.

Triagem é realizada expondo células do tipo ALS a um ou mais compostos de interesse e subsequente determinando se o fenótipo da célula do tipo ALS é alterado em um modo refletindo melhora das características de ALS, tal como uma diminuição em agregados de SOD. Em algumas modalidades, compostos são adicionados individualmente para isolar culturas de células do tipo ALS, tal como culturas em garrafas, pratos, placas individuais ou cavidades em uma placa multicavidade. Em outras modalidades compostos são adicionados como misturas de vários compostos. Em algumas modalidades, compostos são adicionados como bibliotecas combinatórias ou sub-bibliotecas de compostos. Em algumas modalidades as identidades dos compostos ativos dentro de uma mistura de compostos é determinada através de desconvolução de dados obtidos com sobreposição de sub-bibliotecas de compostos. Em outras modalidades a identidade de compostos ativos é determinada através da triagem dos compostos individuais em uma mistura ativa separadamente ou em grupos pequenos. O método de detecção dos compostos ativos em uma mistura de compostos ou em uma biblioteca não é um aspecto crítico da invenção.

Conforme demonstrado no Exemplo 1, o uso de SOD1-Gly93Ala

como o gene SOD mutante causa a formação de agregados de SOD dentro de neurônios motores espinhais de rato transduzidos e células gliais, e vacuolização de neurônios estriais e células gliais de cérebro de rato. As características morfológicas podem ser observadas visualmente através de imunocitoquímica, como pode qualquer reversão de tais características morfológicas quando células transduzidas são tratadas com um agente ou tratamento terapêutico potencial. Em outras modalidades, a observação de fenótipo do tipo ALS é automatizada, por exemplo, através de análise de imagem auxiliada por computador que é capaz de detectar agregação ou vacuolização sem intervenção humana. Tal análise de imagem auxiliada por computador é particularmente preferida na triagem de grandes números de agentes ou tratamentos terapêuticos potenciais. Em ainda outras modalidades, mutantes de SOD1 outros que não Gly93Ala são usados, e o fenótipo de células transduzidas com esses outros genes de SOD1 mutantes pode diferir do fenótipo associado com transdução de SODGly93Ala. Qualquer mudança fenotípica detectável associada com transdução de SOD mutante pode ser usada para avaliar ambos se células foram transduzidas para um fenótipo do tipo ALS e também se um agente ou tratamento terapêutico potencial é eficaz em reverter o fenótipo do tipo ALS.

Compostos que podem ser triados incluem quaisquer compostos que podem ser providos nas culturas de células do tipo ALS. Esses compostos incluem, mas não estão limitados a, produtos naturais (ou misturas brutas ou componentes altamente purificados), compostos sintéticos, bibliotecas combinatoriais e bibliotecas de compostos farmacologicamente ativos conhecidos. Compostos sintéticos podem ser aleatoriamente selecionados ou sintetizados especificamente para uso em tratamento de ALS usando *design* de fármaco sensato. Bibliotecas combinatoriais podem ser derivadas de síntese combinatorial de moléculas pequenas ou através de síntese combinatorial de moléculas poliméricas, tal como oligonucleotídeos, oligossacarídeos ou peptídeos. Bibliotecas a serem avaliadas usando o sistema modelo *in vitro* de ALS da presente invenção podem compreender qualquer número de compostos individuais, incluindo 10, 50, 100, 500, 1000, 10.000, 100.000 a

1.000.000 ou mais. "Triagem com resultado em grande quantidade", conforme aqui usado, refere-se à triagem de mais compostos por tempo unitário (por exemplo, por dia) do que é possível com o mesmo gasto de tempo e esforço usando ensaios tal como o modelo SOD1-Gly93Ala de camundongo transgênico. Em várias modalidades, triagem com resultado em grande quantidade refere-se à triagem de 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 ou mais compostos por dia. Os sistemas modelo da presente invenção podem ser também usados para avaliar tratamentos que não envolvem adição de um agente para a habilidade do tratamento em reverter ou prevenir fenótipo do tipo ALS.

Compostos mostrando eficácia em um ensaio *in vitro* da presente invenção podem ser então estudados mais, por exemplo, em outros ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo* (tal como camundongos de ALS, conforme descrito *supra*) ou em testes clínicos. Tais testes subsequentes são de trabalho relativamente mais intensivo, consumidores de tempo e caros do que o sistema modelo *in vitro* da presente invenção, e então não seria prático avaliar um número grande de compostos usando tais testes de trabalho intensivo. É possível, usando o modelo de ALS *in vitro* da presente invenção, reduzir o número de compostos candidatos suficientemente para tornar tal teste de trabalho intensivo prático. Deste modo o ensaio *in vivo* da presente invenção torna possível a triagem de mais compostos do que seria praticamente possível usando métodos de triagem da técnica anterior, deste modo aumentando as chances de encontro de um primeiro composto eficaz para tratamento ou prevenção de ALS.

25 Usos de Pesquisa Básica de Sistemas Modelo In Vitro de ALS

Os sistemas modelo de ALS da invenção não apenas provêem um método eficiente para triagem de resultado em grande quantidade, eles também provêem um modelo experimental valioso para estudo de patogênese de doença, e definição das bases para vulnerabilidade seletiva de neurônios motores em ALS. Por exemplo, células em cultura primária podem ser transduzidas com um vírion de AAV codificando uma SOD1 mutante associado com ALS, e RNA pode ser coletado das células transduzidas em mo-

mentos de quatro horas a quatro dias pós-transdução. RNA é também obtido de células de controle que são ou transduzidas com vírions de AAV codificando wtSOD1 ou células que não são transduzidas com quaisquer vírions. As amostras de RNA são então submetidas à análise de expressão de gene em um Affymetrix Gene Chip® para determinar quais genes são superexpressos, e quais são subexpressos, nas células modelo de ALS comparado com os controles. Genes mostrando expressão diferencial podem representar caminhos atraentes para intervenção terapêutica.

Sistemas Modelo In Vivo (Animal) de ALS para Avaliar Compostos Terapêuticos

Vetores AAV recombinantes codificando formas mutantes de SOD podem ser também usados para criar novos modelos animais para ALS. Animais podem ser administrados com vetores rAAV (por exemplo, vírions de rAAV) codificando um gene SOD1 mutante para produzir fenótipo do tipo ALS. Animais exibindo um fenótipo alterado, incluindo fenótipos imitando os sintomas de ALS, são então usados em experimentos para testar a eficácia de compostos ou tratamentos terapêuticos potenciais. Compostos que causam uma reversão em fenótipo do tipo ALS podem ser então estudados mais para desenvolvimento como agentes terapêuticos. Animais que podem ser usados em tais modelos ALS incluem, mas não estão limitado a, camundongos, ratos e primatas não-humanos.

Exemplos de modalidades específicas da presente invenção são providos abaixo. Os exemplos são oferecidos para propósitos ilustrativos apenas, e não pretendem limitar o escopo da presente invenção de modo algum.

Exemplo 1:

Modelo In Vitro de ALS em Culturas Neurais Motoras de Rato Primárias

Um sistema modelo *in vitro* para ALS é construído como segue. Dois vetores AAV são criados através de clonagem ou do gene do tipo selvagem de SOD1 humana (hSOD1wt) ou um gene de SOD1 mutante (hSOD1-Gly93Ala) em um vetor derivado de AAV-2 compreendendo duas repetições terminais invertidas de AAV (ITRs) de modo que a expressão do

gene de SOD é direcionada pelo promotor de beta-actina de galinha.

O vetor rAAV2-SOD1-Gly93Ala resultante é então empacotado em vírions AAV-2 (vide Patentes U.S. Nos. 6.001.650 e 6.004.797) e usado para transduzir culturas neurais motoras de rato primárias. Microscopia de fluorescência 3-5 dias pós-transdução descreve que células transduzidas exibem mudanças patológicas características de ALS, tal como distribuição anormal de proteína SOD mutante em agregados pontuados na maioria dos neurônios motores expressando SOD mutante, extensões de citoplasma pericarial e inchaço de processos neurais motores, morte apoptótica de neurônios motores e ativação de astrócitos. rAAV2-SOD1wt é usado como um controle no modelo de ALS da invenção uma vez que transdução com este vetor não causa quaisquer mudanças fenotípicas associadas com ALS nas células-alvo.

A presença de SOD foi visualizada com imunoistoquímica em neurônios motores em uma cultura primária de um cordão espinhal de rato de aproximadamente 3-5 dias após transdução com vetores AAV-2 codificando pVm-WTSOD ou pVm-G93ASOD, respectivamente. Imunoistoquímica foi realizada com um anticorpo primário IgG anti-SOD1 de camundongo e um anticorpo secundário IgG anti-camundongo de cabra marcado com Alexa-594. Neurônios transduzidos com pVm-G93ASOD mostram SOD1 agregado que não é observado em neurônios transduzidos com pVm-WTSOD.

A presença de SOD foi visualizada através de imunoistoquímica em células gliais em uma cultura primária de cordão espinhal de rato aproximadamente 3-5 dias após transdução com vetores AAV2 codificando pVm-WTSOD ou pVm-G93ASOD, respectivamente. Células gliais transduzidas com pVm-G93ASOD mostram SOD1 agregado que não é observado em células gliais transduzidas com pVm-WTSOD.

Experimentos separados são realizados, analogamente àqueles descritos acima, mas usando vetores AAV derivados de AAV-5 e AAV-6, isto é, vetores AAV onde as ITRs são derivadas de AAV-5 e AAV-6, respectivamente. Virions de rAAV-5 e rAAV-6 são então produzidos usando sistemas de empacotamento que usam genes de proteína capsídeo de AAV-5 ou

AAV-6, respectivamente.

A presença de SOD foi visualizada através de imunoistoquímica em neurônios motores em uma cultura primária de cordão de rato espinhal de aproximadamente 3-5 dias após transdução com vetores AAV-6 codificando pVm-WTSOD ou pVmG93ASOD. Neurônios transduzidos com pVm-G93ASOD mostram SOD1 agregado que não é observado em neurônios transduzidos com wtSOD1.

Resultados mostram que genes aplicados usando vírions de rAAV-6 são predominantemente expressos em neurônios enquanto genes aplicados usando vírions de rAAV-2 são expressos ambos em neurônios e em glia (conforme discutido *supra*). Genes aplicados usando vírions de rAAV-5 são expressos apenas em glia, e transdução de vírion de rAAV-5 não causou patologia em neurônios motores.

Os efeitos fenotípicos de transdução de rAAV-SOD em neurônios motores são medidos novamente 6-7 dias e 12 dias pós-transdução. Os resultados mostram progressão de agregação com o tempo levando à morte celular em 12 dias pós-transdução. A presença de SOD foi visualizada através de imunoistoquímica em neurônios motores em uma cultura primária de um cordão espinhal de rato aproximadamente 6-7 dias após transdução com vetores AAV2 codificando pVm-G93ASOD. Agregação de SOD1 em neurônios transduzidos com pVm-G93ASOD é mais extensiva do que ela era em 3-5 dias após transdução, ilustrando a progressão de dano com o tempo. A presença de SOD foi visualizada através de imunoistoquímica em neurônios motores em uma cultura primária de cordão espinhal de rato aproximadamente 12 dias após transdução com vetores AAV2 codificando pVm-G93ASOD. Os resultados mostram que SOD-Gly93Ala é tóxico para as células, e que ele eventualmente as mata.

A morfologia de neurônios motores 6-7 dias após transdução com rAAV-SOD1-G93A foi avaliada e comparada com a morfologia de neurônios motores de um paciente com ALS. A presença de SOD foi visualizada através de imunoistoquímica em uma cultura primária de cordão espinhal de rato aproximadamente 6-7 dias após transdução com vetores AAV2 codifi-

cando pVm-G93ASOD. Células transduzidas com rAAV-SOD1-G93A em cultura exibem o mesmo inchaço axonal focal característico de neurônios motores de ALS, sugerindo que o sistema modelo de ALS *in vitro* da presente invenção imita o estado de doença. Neurônios transduzidos com pVm-G93ASOD mostram extensões de citoplasma pericarial e inchaço de processos neurais motores nos dias 6-7 que são similares àqueles vistos em neurônios motores de pacientes com ALS.

Os mesmos vírions usados para transduzir culturas de cordão espinhal de rato (*supra*) são também usados para transduzir neurônios estriatais de culturas de cérebro de rato primárias. Imunocitoquímica das células transduzidas 3-5 dias pós-transdução mostra que neurônios estriatais exibem vacuolização quando transduzidos com vetores expressando SOD1-G93A. Um fenótipo similar é observado quando células gliais de uma cultura primária de cérebro de rato são transduzidas com vetores AAV expressando SOD1-G93A. As células gliais do cérebro exibem vacuolização quando transduzidas com pVm-G93ASOD, conforme contrastado com o agregamento observado com tratamento similar de células gliais espinhais (discutido *supra*). Este fenótipo observado nas células de cérebro contrasta com a formação de agregado de SOD1 observada em neurônios motores espinhais e glia transduzidos.

Experimentos confirmam que as células expressando SOD1-G93A são de fato neurônios motores. Imunocitoquímica foi realizada em células em uma cultura primária de cordão espinhal de rato aproximadamente 5-6 dias pós-transdução com rAAV-SOD1wt ou rAAV-SOD1-G93A. Um primeiro experimento envolveu detecção imunocitoquímica de ambos SOD e neurofilamento leve (NF-L). Ambos SOD e neurofilamento leve (NF-L) foram detectados em neurônios motores em uma cultura primária de cordão espinhal de rato aproximadamente 3-5 dias após transdução com vetores AAV2 codificando pVm-WTSOD ou pVm-G93ASOD, respectivamente. NF-L é um marcador neural específico. Tingimento de ambos SOD e NF-L na mesma célula confirma que a célula é um neurônio. Um segundo experimento envolve detecção imunocitoquímica de ambos SOD e colina acetiltransferase

(ChAT). Ambos SOD e colina acetiltransferase (ChaT) foram detectados em neurônios motores em uma cultura primária de cordão espinhal de rato aproximadamente 3-5 dias após transdução com vetores AAV-2 codificando pVm-WTSOD ou pVm-G93ASOD, respectivamente. ChAT é um marcador específico para neurônios motores. Tingimento de ambos SOD e ChAT na mesma célula confirma que a célula é um neurônio motor. Esses experimentos demonstram expressão de SOD dentro das células expressando proteínas que são características de neurônios motores.

Microscopia por fluorescência indica que aproximadamente 90% de todas as células na cultura neural motora de rato primária são transduzidas. A alta eficiência de transdução usando rAAV-SOD1-Gly93Ala provê um grande número de células adequadas para uso no ensaio com relativamente pouco trabalho, simplesmente através da adição do número apropriado de partículas virais e incubação. Neste exemplo células são transduzidas com 100.00 partículas de rAAV-SOD1-Gly93Ala por célula, isto é, a multiplicidade de infecção (MOI) é 105. Outros experimentos (não mostrados) mostram que uma MOI tão baixa quanto 1000 é igualmente eficaz na provisão de transdução máxima (90%). O número alto de células transduzidas torna possível observar os efeitos de qualquer dado composto de interesse em um número estatisticamente significativo de células diferentes, e então permite conclusões estatisticamente robustas. Isto deve ser contrastado com métodos anteriores envolvendo microinjeção de plasmídeos codificando SOD mutante em células individuais, que como uma matéria prática não é capaz de prover um número estatisticamente significativo de células para triagem de resultado em grande quantidade.

Este modelo epigenético, que emprega um vetor viral transduzindo um grande número de neurônios motores e outras células simultaneamente, pode facilitar estudos da patologia molecular de ALS, a geração de novos modelos animais de ALS e triagem de fármacos para ALS.

Materiais e métodos para Exemplo 1 são como segue.

Construção de plasmídeos de SOD ofpVm-wtSOD e pVm-G93A

Genes de SOD humanos de tipo selvagem e mutante G93A são

amplificados através de PCR com o *iniciador* adiantando contendo um sítio HindIII incorporado e o *iniciador* reverso com um sítio NotI incorporado.

5'-AGCTAAGCTTCCACCATGGCGACGAAGGCCGTGTG-3' (No. HC146)
(SEQ ID NO. 2)

5 5'-ATATGCGGCCGCTTATTGGGCGATCCCAATACACCA-3' (No. HC 147)
(SEQ ID NO. 3).

Os produtos de PCR são digeridos com enzimas de restrição HindIII e NotI e clonados nos sítios HindIII e NotI de plasmídeo F101, e os genes são postos sob o controle de promotor de beta-actina de galinha e
10 flanqueados por ambas ITRs de AAV para criar os plasmídeos F101-wtSOD e F101-G93A. wtSOD e G93A, junto com o promotor beta-actina de galinha, são cortados de F101-wtSOD e F101-G93A com BglII e NotI e clonados nos sítios SphI e NcoI de pVm-LacZ usando ligantes SphI-BglII e NotI-wtSOD. Os construtos são verificados através de análise de sequenciamento e cha-
15 mados pVm-wtSOD (Figura 2) e pVm-G93ASOD (Figura 1). Os plasmídeos são então amplificados e usados para transfectar células 293 para produzir vetores AAV.

Culturas neurais primárias

Culturas primárias de cordão espinhal ou cérebro dissociado são
20 preparadas a partir de embriões de rato Sprague-Dawley de 15 dias. Tecido de estriato ou cordão espinhal dissecado é moído em pequenos pedaços e incubado com tripsina por 30 minutos. Seguindo dissociação, o tecido é então triturado através de uma pipeta Pasteur e células são postas em placa em uma densidade de 350.000 (neurônios estriatais) ou 700.000 células
25 (neurônios do cordão espinhal) por cavidade em placas de cultura de 12 cavidades (Fisher Scientific, Chicago, IL), contendo coberturas de vidro de 18 mm, redondas (Fisher Scientific, Chicago, IL) revestidas com poli-D-lisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Para culturas estriatais o meio é meio neurobasal (Invitrogen, Chicago, IL) suplementado com 2% de B-27, L-glutamina a 0,5 mM e ácido L-glutâmico a 25 mM. Culturas são alimentadas
30 uma vez por semana a fim de manter as células. Para culturas de cordão espinhal o meio é meio essencial mínimo *eagle* (EMEM), (ATCC, Manassas,

Virginia) enriquecido com 2,5 g de D-glicose e suplementado com 2% de soro de cavalo, 5% de soro bovino fetal, 1% de *Penstrep* e fatores de crescimento. As culturas são alimentadas duas vezes por semana para se obter crescimento e estabilidade celular ótimos. Células não-neurais são minimizadas através de tratamento das culturas nos dias 4-6 com 1,4 µg/ml de citosina-B-D-arabinose (Calbiochem). As culturas são mantidas a 37° C em CO₂ a 5%. As células são usadas nos experimentos 2-3 semanas após dissociação, a fim de permitir crescimento neuronal motor e diferenciação de outros neurônios.

10 Tratamento de culturas

Culturas estriatais e culturas de cordão espinhal são incubadas com AAV-hSODwt ou AAV-hG93A (10⁵ genomas de vetor (vg) por célula) para atingir expressão de vetores máxima.

Imunocitoquímica

15 Células estriatais e de cordão espinhal cultivadas em coberturas de vidro são fixadas com 4% de paraformaldeído e permeabilizadas por 0,05% de NP-40. Solução de bloqueio contendo IX PBS, 3% de BSA e 2% de soro de cabra é usada. Imunocitoquímica é realizada com os seguintes anticorpos: Neurofilamento-L (NF-L; AB1983; 1:100, Chemicon Inc.), Colina
20 Actiltransferase (ChAT; AB143 e MAB305 1:10, Chemicon, Inc.), Superóxido Dismutase (SOD; 52 1:300, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP; AB5804, 1:500, Chemicon Inc.). Todos os anticorpos são diluídos em solução de bloqueio. Distribuição de anticorpo é visualizada através de microscopia de epifluorescência após incubação com anti-
25 corpos secundários: conjugado IgG de anticamundongo/anticoelho/anti-rato para Alexa Fluor 488 (verde) ou Alexa Fluor 594 (vermelho), diluído 1:200 (Molecular Probes).

Exemplo 2:

Avaliação de um Peptídeo de IL-10 como um Candidato para
30 Tratamento de ALS

O valor do sistema modelo de ALS *in vitro* do Exemplo 1 da invenção é ilustrado através de um ensaio para avaliar o efeito de um peptídeo

derivado de IL-10 sobre ALS.

Fabricação de oligopeptídeo é conseguida através de métodos de síntese de fase sólida conhecidos daqueles versados na técnica. Análise dos oligopeptídeos sintetizados inclui espectrometria de massa por eletropulverização, cromatografia líquida de alto desempenho e aparência visual do produto purificado. O(s) oligopeptídeo(s) é(são) preparado(s) em água para injeção a 1 mg/ml. Um exemplo de um peptídeo derivado de IL-10 apropriado (Patente U.S. No. 6.159.937) e um peptídeo de controle 'embaralhado' são providos na Tabela 2. Seqüências de peptídeo são providas na direção terminal N→C convencional. Aminoácidos são nomeados usando a nomenclatura de três letras.

Tabela 2:

Peptide de IL-10 Humano Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn (SEQ ID NO. 4) Peptídeo 'embaralhado' Arg-Ile-Lys-Asn-Met-Ala-Thr-Tyr-Met (SEQ ID NO. 5)
--

Embora uma seqüência de peptídeo exemplar seja provida na Tabela 2, seria claro a um versado na técnica que várias modificações ou substituições poderiam ser feitas à seqüência listada que reteriam, e talvez melhorassem, a eficácia do peptídeo em tratamento de dor neuropática ou doença neurodegenerativa, ou melhorariam suas propriedades farmacológicas. Tais variantes de seqüência poderiam ser testadas em um ou mais dos modelos descritos nos exemplos que seguem para avaliar sua eficácia terapêutica.

Por exemplo, seqüências de IL-10 de espécies não-humanas poderiam ser usadas para se obter seqüências de peptídeo derivadas de IL-10 diferindo do peptídeo derivado de IL-10 humano, peptídeos derivados de IL-10 humanos que podem exibir propriedades aperfeiçoadas comparado com a seqüência derivada de ser humano. Alternativamente, variantes podem ser feitas através de inspeção usando parâmetros empíricos conhecidos familiares àqueles versados na técnica de peptídeos terapêuticos. Adicionalmente, projeto de fármaco racional pode ser usado para construir uma

variante de sequência que seria esperada exibir eficácia aumentada, *design* de fármaco racional que pode ser baseado em análise da estrutura tridimensional de uma IL-10, um receptor de IL-10, ou um complexo de IL-10 com um receptor.

- 5 Culturas primárias de cordão espinhal de rato são incubadas com vírions de rAAV2-SOD1-G93A para produzir uma cultura de células compreendendo uma ou mais células de neurônio motor transduzidas expressando SOD1-G93A. Os peptídeos de IL-10 e embaralhados descritos acima são adicionados (em triplicata) a placas de cultura de tecido contendo
- 10 culturas de células transduzidas com rAAV-SOD1-G93A em vários momentos após transdução. Placas de controle de células transduzidas não são tratadas com nenhum peptídeo. Imunocitoquímica de SOD é realizada como uma função de tempo após adição de peptídeo para determinar se o peptídeo de IL-10, o peptídeo embaralhado ou ambos melhoram os efeitos fenotípicos de expressão de SOD1-G93A (isto é, formação de agregado de SOD
- 15 intracelular ou morte celular).

- Se agregação menor ou morte celular for observada em culturas tratadas com um ou ambos peptídeos, o peptídeo dando resultados positivos no ensaio *in vitro* da presente invenção é então submetido a estudo mais
- 20 extensivo (por exemplo, estudos *in vivo* em camundongos com ALS). Resultados positivos nos ensaios *in vitro* da presente invenção incluem redução em formação de agregado de SOD ou morte celular em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98% ou mais. Eficácia em tratamento ou prevenção de ALS é por fim confirmada através de testes clínicos em indivíduos humanos.

- 25 Em outros experimentos, 500 variantes de sequência do peptídeo de IL-10 mostrado acima são sintetizadas e ensaiadas quanto à atividade em redução do fenótipo tipo ALS em neurônios motores transduzidos com rAAV-SOD1-G93A. Os peptídeos mostrando a maior atividade são estudados mais quanto à eficácia em tratamento ou prevenção de ALS.

- 30 Exemplos representativos, não-limitantes, de outras sequências de IL-10 para uso com a presente invenção incluem as sequências descritas nos números de acesso NCBI NM000572, U63015, AF418271, AF247603,

AF247604, AF247606, AF247605, AY029171, UL16720 (todas seqüências humanas), NM012854, L02926, X60675 (rato); NM010548, AF307012, M37897, M84340 (todas seqüências e camundongo), U38200 (equina); U39569, AF060520 (seqüências felinas); U00799 (bovina); U11421, Z29362
 5 (seqüências ovinas); L26031, L26029 (seqüências de macaque); AF294758 (macaco); U33843 (canina); AF088887, AF068058 (seqüências de coelho); AF012909, AF120030 (seqüências de marmota); AF026277 (gambá); AF097510 (porquinho-da-índia); U1767 (cervo); L37781 (gerbil); AB 107649 (lhama e camelo).

10 Exemplo 3:

Triagem de Peptídeos de GDNF como um Candidato para Tratamento de ALS

O valor do sistema modelo de ALS *in vitro* do Exemplo 1 da invenção é ilustrado mais através de um ensaio para avaliar o efeito de um
 15 peptídeo de fator neutrófico derivado de célula glial (GDNF) sobre ALS. Experimentos são realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 2 exceto que um peptídeo derivado de GDNF e uma versão embaralhada dele são providos ao invés do peptídeo de IL-10. Se um peptídeo de GDNF mostrar um resultado positivo no ensaio (isto é, se houver uma redução em ca-
 20 racterísticas fenotípicas tipo ALS de neurônios motores transduzidos após tratamento com o peptídeo), este peptídeo pode ser estudado mais para confirmar sua eficácia no tratamento ou prevenção de ALS.

Em outros experimentos, 500 peptídeos derivados de GDNF diferentes são sintetizados e ensaiados quanto à atividade na redução de fe-
 25 nótipo tipo ALS em neurônios motores transduzidos com rAAV-SOD1-G93A. Os peptídeos mostrando a maior atividade são estudados mais quanto à eficiência em tratamento ou prevenção de ALS.

Peptídeos de GDNF para uso na presente invenção podem ser derivados de várias seqüências de GDNF conhecidas, incluindo aquelas
 30 descritas nas Patentes U.S. Nos. 6.221.376 e 6.363.319, incorporadas aqui a título de referência em suas totalidades, e Lin e outros, *Science* (1993) 260:1130-1132 para seqüências de rato e humanas, bem como números de

acesso NCBI AY052831, AJ001896, AF053748, AF063586 e L19063 para seqüências humanas; números de acesso NCBI AF184922, AF497634, X922495, NM019139 para seqüências de rato; número de acesso NCBI AF516767 para uma seqüência de panda gigante; números de acesso NCBI XM122804, NM10275, D88351S1, D49921, U36449, U37459, U661955 para seqüências de camundongo; número de acesso NCBI AF469665 para uma seqüência nippon Nipponia; número de acesso NCBI AF106678 para uma seqüência de *Macaca mulatta*; e número de acesso NCBI NM131732 e AF329853 para seqüências de peixe zebra. Seqüências de GDNF são também reveladas no Pedido de Patente U.S. No. 2003/0161814.

Essas e outras modalidades da presente invenção ocorrerão prontamente àqueles versados na técnica em vista da presente descrição. Embora modalidades preferidas da presente invenção tenham sido descritas em alguns detalhes, é compreendido que variações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da invenção conforme definido aqui. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados aqui são incorporados aqui a título de referência em suas totalidades.

Sequência de Listagem

<110> Genzyme Corporation
Doroudchi, Mohammed M

<120> Vetores AAV Codificando Superóxido Dismutase

<130> 1054

<140> 60/697,450

<141> 2005-07-07

<160> 5

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly
1 5 10 15

Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp
20 25 30

Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His
35 40 45

Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe
50 55 60

Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His
65 70 75 80

Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala Asp
85 90 95

Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile
100 105 110

Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys
115 120 125

Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu
130 135 140

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
145 150

<210> 2

<211> 35

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador Avançado

<400> 2
 agctaagctt ccaccatggc gacgaaggcc gtgtg

35

<210> 3
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador Avançado

<400> 3
 atatgcggcc gcttattggg cgatcccaat tacacca

37

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Peptideo IL-10 Humano Disperso

<400> 5

Arg Ile Lys Asn Met Ala Thr Tyr Met
 1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Vetor de vírus adeno-associado recombinante (AAV) compreendendo: pelo menos uma seqüência de repetição terminal invertida (ITR) de AAV; e um gene codificando superóxido dismutase (SOD).
- 5 2. Vetor de acordo com a reivindicação 1, onde o SOD é SOD1.
3. Vetor de acordo com a reivindicação 2, onde o SOD1 contém uma mutação associada com ALS.
4. Vetor de acordo com a reivindicação 3, onde o SOD1 contém uma mutação de Gly93Ala.
- 10 5. Vetor de acordo com a reivindicação 1, onde o vetor AAV é um plasmídeo.
6. Vetor de acordo com a reivindicação 1, onde o vetor AAV é um vírion.
7. Vetor de acordo com a reivindicação 6, onde o vírion de AAV
15 é derivado de AAV-2.
8. Vetor de acordo com a reivindicação 6, onde o vírion de AAV é derivado de AAV-5.
9. Vetor de acordo com a reivindicação 6, onde o vírion de AAV é derivado de AAV-6.
- 20 10. Método de tratamento de um indivíduo compreendendo: administrar ao dito indivíduo um vetor AAV codificando SOD.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, onde o indivíduo tem um distúrbio selecionado do grupo consistindo em ALS, doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, síndrome de Down,
25 artrite reumatóide, doença de Crohn, doença de Peyronie, colite ulcerativa, degeneração macular, retinite pigmentosa, cataratas, isquemia cerebral, infarto do miocárdio, trauma cerebral, trauma ao cordão espinhal, dano por reperfusão, esquizofrenia, epilepsia, leucemia humana e diabetes.
12. Método de avaliação de compostos quanto à eficácia no tra-
30 tamento ou prevenção de esclerose amiotrófica lateral (ALS) compreendendo:

transdução de uma célula com um vetor AAV codificando SOD1

contendo uma mutação associada com ALS para produzir uma célula transduzida, onde a dita célula transduzida exibe característica fenotípica associada com ALS;

5 exposição da dita célula transduzida a um composto de interesse;
se;

determinação de se ou não a célula transduzida exposta ao composto de interesse exibe uma redução nas características fenotípicas associadas com ALS.

10 13. Modelo *in vitro* para avaliação de compostos quanto à eficácia no tratamento de ALS compreendendo:

uma pluralidade de células transduzidas com um vetor AAV codificando um SOD contendo uma mutação associada com ALS.

14. Modelo de acordo com a reivindicação 12 ou reivindicação 13, onde a mutação é Gly93Ala.

15 15. Modelo de acordo com a reivindicação 13, onde a pluralidade de células transduzidas com o vetor AAV compreende pelo menos 80% de todas as células em uma população de células em cultura.

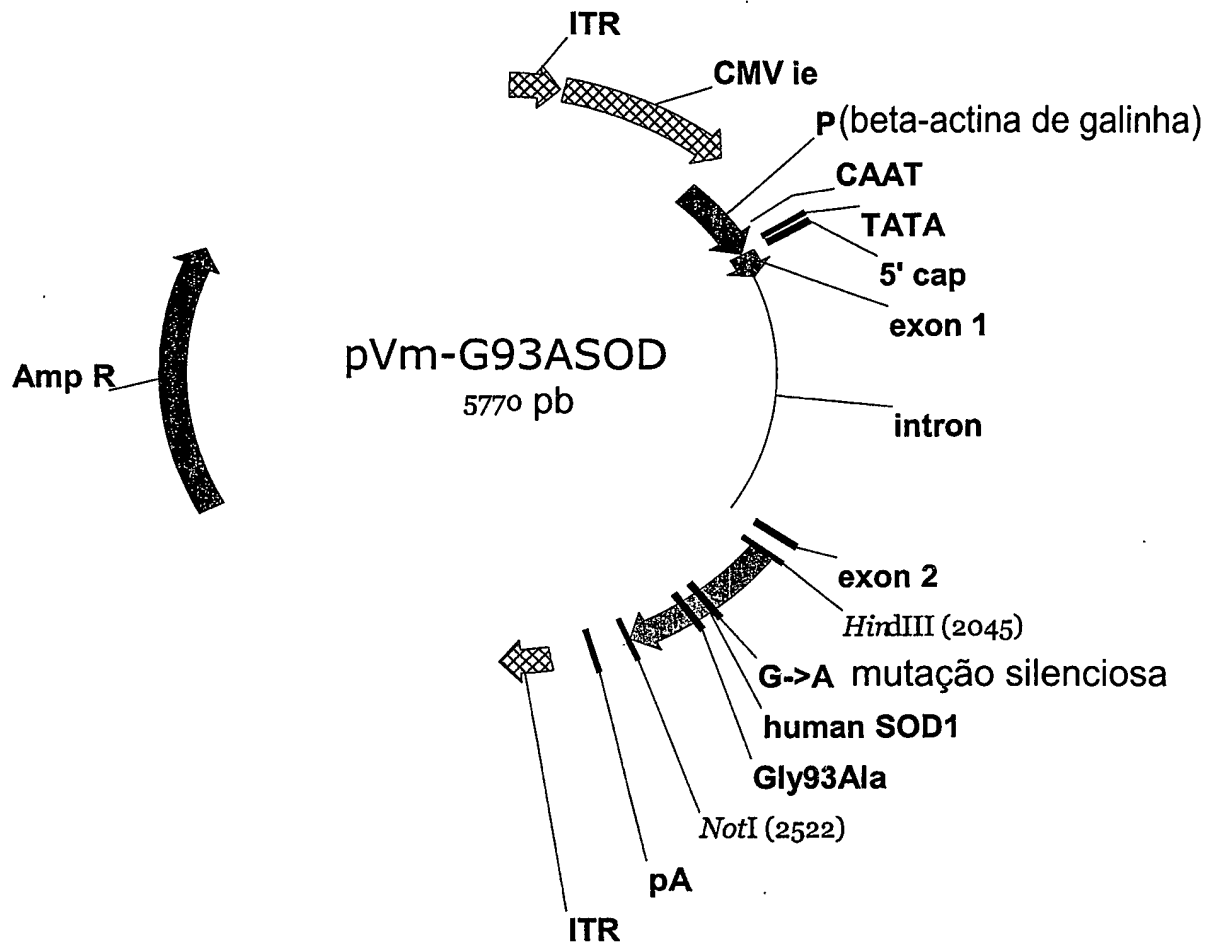


FIG.1

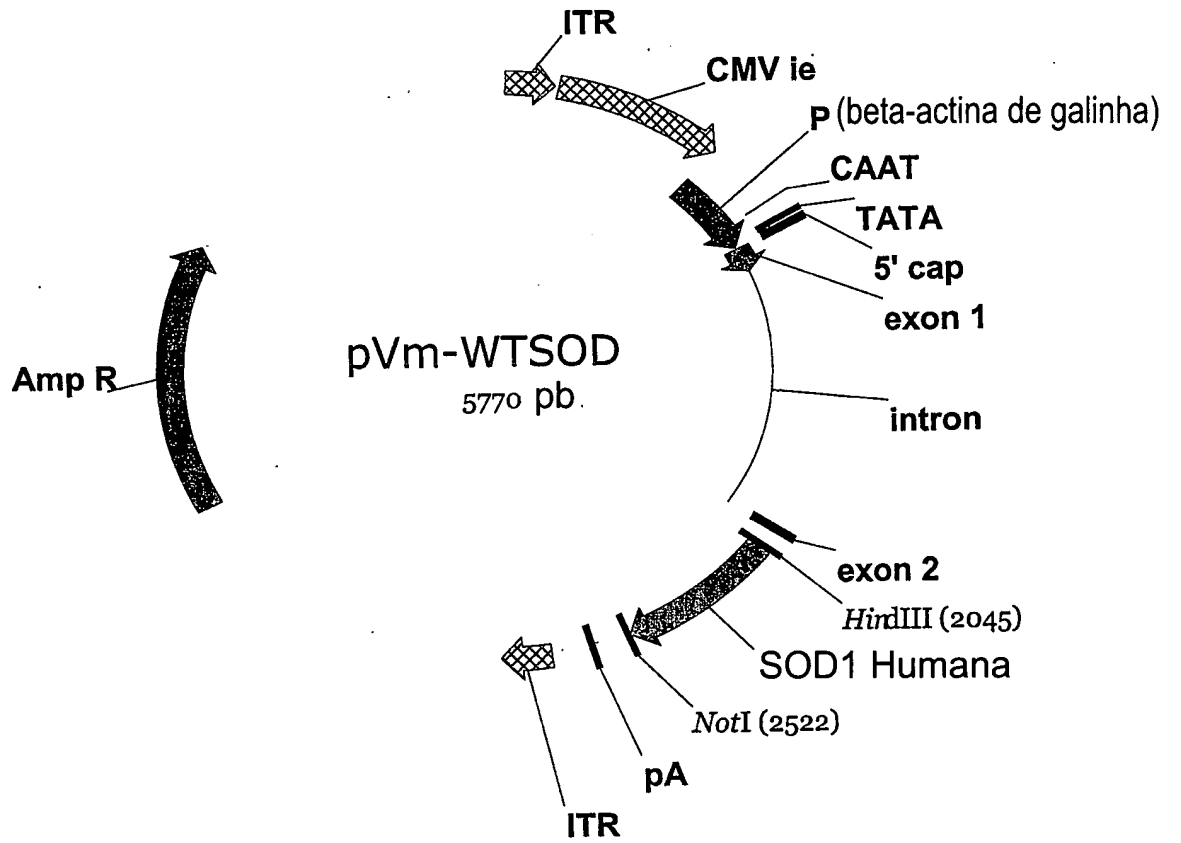


FIG.2

RESUMO

Patente de Invenção: "**VETORES AAV CODIFICANDO SUPERÓXIDO DISMUTASE**".

A presente invenção refere-se a vetores de vírus adeno-associado (AAV) codificando superóxido dismutase (SOD), onde o vetor AAV codificando SOD (AAV-SOD) pode ser usado para aplicar o gene SOD a células alvo. As células alvo podem estar dentro de um indivíduo tendo uma doença ou condição para a qual a aplicação de SOD às células alvo provê um benefício terapêutico e/ou um efeito terapêutico no indivíduo. Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um sistema modelo para avaliação de compostos quanto à eficácia em tratamento de esclerose amiotrófica lateral (ALS). O sistema modelo pode compreender uma pluralidade de células transduzidas com um vetor AAV codificando um gene SOD; as células transduzidas podem exibir uma mudança fenotípica associada com ALS. O sistema modelo da invenção pode ser usado para avaliar compostos quanto à eficácia no tratamento de ALS.